Wachstumsphysiologische Untersuchungen an Micrococcus denitrificans Beij.

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August Universität zu Göttingen

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Vorgelegt von
Margarete Vogt
aus Recklinghausen/Westfalen

Göttingen 1964

Diese Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie
der Georg-August-Universität zu Göttingen durchgeführt.

D 7

Referent: Professor Dr. H. G. Schlegel

Korreferent: Professor Dr. A. Pirson

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 1964

Archiv für Mikrobiologie 50, 256—281 (1965)

Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen

Wachstumsphysiologische Untersuchungen an Micrococcus denitrificans Beij. *

Von

MARGARETE VOGT

Mit 15 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Oktober 1964)

* Gekürzte gleichlautende Dissertation der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen 1964.

Bis 1953 war kein Organismus bekannt geworden, der unter Oxydation von Wasserstoff mit Hilfe von Nitrat C-autotroph zu leben vermag.

Foster (1951) hat die Existenz eines chemolithotrophen Bakteriums, das CO_2 fixiert und (nach Gl. 6) (S. 261) Energie gewinnt, vorausgesagt. Kluyver (1953) griff das Postulat Fosters wieder auf und prüfte zunächst mehrere Nitrat reduzierende Bakterien auf die Fähigkeit, chemolithotroph als H_2-oxydierende Denitrifikanten zu wachsen. Nachdem diese Versuche erfolglos geblieben waren, gelang es, ein Bakterium anzureichern, das anaerob unter H_2-Atmosphäre mit Nitrat als H-Acceptor und Kohlendioxyd als C-Quelle wuchs. Nach Übertragung in frisches Medium hörte das Wachstum jedoch auf. Erst als den Submerskulturen eine Spur Hefeextrakt zugesetzt wurde, erfolgte Wachstum unter diesen weitgehend chemolithotrophen Bedingungen. Schließlich stellte sich heraus, daß auch der von Beijerinck u. Minkman (1910) isolierte Stamm unter chemo-autotrophen Bedingungen zu wachsen vermochte, wenn Hefeextrakt zugegen war.

Micrococcus denitrificans ist insofern ein bemerkenswertes Bakterium, als es sowohl organotroph mit Glucose oder einer Reihe anderer organischer Substrate, als auch lithotroph mit CO_2 als Haupt-C-Quelle zu wachsen vermag und dabei sowohl Sauerstoff (unter aeroben Bedingungen) als auch Nitrat (unter anaeroben Bedingungen) als H-Acceptoren verwerten kann. Von den übrigen chemolithotrophen Bakterien hebt es sich jedoch dadurch ab, daß es unter autotrophen Bedingungen Hefeextrakt benötigt. Unter organotrophen Bedingungen besteht dieser Anspruch nicht.

Über das Wachstum, insbesondere die Induzierbarkeit der an der Nitrat-Reduktion und H_2-Aktivierung beteiligten Enzyme, liegen bereits eingehende Untersuchungen von Kluyver u. Mitarb. vor (Verhoeven, Koster u. van Nievelt 1954; Kluyver u. Verhoeven 1954; Verhoeven 1956). Auch über den Mechanismus der CO_2-Fixierung (Kornberg, Collins u. Bigley 1960), die Verwertung von Glykolsäure (Kornberg u. Morris 1963), die Verwertung von Di-

stickstoffoxyd als H-Acceptor (Pichinoty u. d'Ornano 1961) und die an der Atmung beteiligten Cytochrome (Vernon u. White 1957, Fewson u. Nicholas 1961) liegen bereits Untersuchungen vor.

Versuche, einen auxo-autotrophen Stamm von *Micrococcus denitrificans* anzureichern und zu isolieren, standen bisher noch aus; auch fehlten vertiefte Untersuchungen über die Verwertung von Distickstoffoxyd, Nitrit und Nitrat und die geschwindigkeitsbestimmenden und das Wachstum begrenzenden Reaktionen. Zu diesen Fragestellungen tragen die hier dargelegten Untersuchungen bei, die an einem neu isolierten Stamm durchgeführt wurden.

Methodik

1. Nährmedien und Anzucht der Zellen

Die Anzucht von *Micrococcus denitrificans* erfolgte in einer Nährlösung, die folgende Komponenten enthielt: a) 1,0 g NH_4Cl; 0,5 g KCl; 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$; 5,0 g KNO_3; b) 0,55 g $NaHCO_3$; c) 5,0 g Na-Glutaminat; d) 5,0 g Glucose; e) 1,0 g KH_2PO_4; 1,37 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$; f) 10,0 mg EDTA; 2,0 mg $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$; 2,0 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$; 0,01 g $CaCl_2$; 1,0 ml Hoaglandsche Spurenelementlösung in 1000 ml dest. Wasser. Die verschiedenen Lösungen wurden getrennt sterilisiert und nach dem Abkühlen vereinigt.

Für die aerobe und anaerobe organotrophe Kultur wurden die Komponenten a, b, c, d, e und f vereinigt. Für die Heranzucht unter chemolithotrophen Bedingungen wurden die organischen Zusätze weggelassen und die Komponenten a, b, e und f vereinigt; außerdem wurden 50 mg Difco-Hefeextrakt und 20 ml Bodenextrakt zugefügt.

Größere Zellmengen wurden in 6 l-Zweihalskolben, die 3 l der angegebenen Nährlösung enthielten, unter Magnetrührung bei 28° C herangezogen (Schlegel, Kaltwasser u. Gottschalk 1961). Der Gasraum der Zweihalskolben wurde aus Gasometern mit einem Gemisch von 85% H_2 und 15% CO_2 (anaerob); 85% N_2 und 15% CO_2 (anaerob) oder 65% H_2, 20% O_2 und 15% CO_2 (aerob) gefüllt und während des Wachstums in Verbindung mit diesem Gasometer gehalten. Der eine Kolbenhals diente der Begasung, der andere war mit einem Gummistopfen verschlossen, durch welchen eine Impfkanüle mit Teflonschlauch bis in die Nährlösung reichte. Durch diese Kanüle erfolgte die Probeentnahme.

Für die Dauerkultur bewährte sich ein Nährboden, der aus 0,5% KNO_3, 0,5% Glucose, 0,5% Pepton und 1,5% Agar besteht.

Trockenkulturen wurden durch Abschwemmen gut bewachsener Schrägagarröhrchen mit einer 0,3% Ascorbinsäure enthaltenden Magermilch und Trocknen dieser Suspension über P_2O_5 im Vakuumexsikkator hergestellt.

Die zur Kultur unter anaeroben Bedingungen verwendeten Gase wurden durch Waschen mit alkalischem Pyrogallol (20% Pyrogallol, 20% KOH bzw. Na_2CO_3) von Sauerstoffverunreinigungen befreit.

Auf Sauerstofffreiheit wurde mit dem Methylenblauindicator nach Ulrich u. Larsen (1948) geprüft.

2. Analytische Methoden

Proteinbestimmung. Der Gehalt an Zellprotein wurde nach der Biuret-Methode bestimmt, die nach La Rivière abgeändert war (Schmidt, Jensen u. Schlegel 1963).

Glucosebestimmung. Die Glucose-Abnahme wurde quantitativ nach der Somogy-Nelson-Methode bestimmt (nach SAKAMI 1955).

Bestimmung von Poly-β-hydroxybuttersäure (PHBS). Sie erfolgte nach WILDE (1962).

Qualitativer Nachweis der PHBS. Die gereinigte PHBS wurde über Paraffinspänen und P_2O_5 im Exsikkator getrocknet, der Schmelzpunkt lag zwischen 180 und 182° C. Dieser Wert liegt im Bereich der bisher gemessenen Werte (SCHLEGEL u. GOTTSCHALK 1962; SCHLEGEL 1962).

Nitritbestimmung. Nitrit wurde nach dem von WILSON u. KNIGHT (1952) beschriebenen Verfahren bestimmt (Griess-Ilosvay-Methode).

Gaswechselmessungen. Zur manometrischen Messung der Gasaufnahme bzw. Gasabgabe dienten zweiarmige Warburggefäße mit 16—18 cm^3 Volumen. Geschüttelt wurden die Gefäße in einer Rundwarburg-Apparatur (Modell V, Braun/Melsungen) mit 120 Hin- und Hergängen pro Minute und einer Wasserbadtemperatur von 30° C. Es wurden die in UMBREIT, BURRIS u. STAUFFER (1957) angegebenen Methoden angewandt.

Trübungsmessung. Die Trübungsmessung wurde im Eppendorf-Photometer mit der Hg-Lampe bei 436 mμ und mit der Photozelle 90b oder im Zeiss-Elko II mit dem Filter 53 E 58 vorgenommen. Bis zu einer Extinktion von 0,3 bei 436 mμ (d = 1 cm) braucht nicht verdünnt zu werden. War die Bakteriensuspension dichter, so wurde so weit verdünnt, daß die Meßwerte in den Extinktionsbereich von 0,1—0,3 fielen.

Chromatographie der Zucker. Chromatographie-Papier 2043b (58×60 cm) der Firma Schleicher und Schüll wurde benutzt. Lösungsmittel: Essigsäure-Äthylester + Pyridin + H_2O (50:20:50).

Zur Prüfung auf O_2-Freiheit im Kulturgefäß wurde der Methylenblau-Indicator nach ULRICH u. LARSEN (1948) benutzt.

Ergebnisse

1. Anreicherung und Charakterisierung

Da *Micrococcus denitrificans* bisher lediglich von BEIJERINCK (1910) beschrieben und von VERHOEVEN, KOSTER u. VAN NIEVELT (1954) angereichert worden war, sollten zum Vergleich neue Stämme isoliert werden. Das Ziel der erneuten Anreicherung war die Isolierung von Stämmen, die unter chemolithotrophen Bedingungen ohne Wuchsstoffzusatz wuchsen.

Zur Anreicherung wurde eine neben den üblichen Mineralien NH_4Cl, KNO_3 und $NaHCO_3$ enthaltende Nährlösung mit Boden-, Schlamm- und Wasserproben beimpft und unter einer Atmosphäre von 85% H_2 und 15% CO_2 gehalten. Es wurden Garten-, Acker-, Wiesen- und Waldböden in der Umgebung von Göttingen und des Westharzes, sowie verschiedene Schlammproben verwendet.

Das Aufkommen eines H_2-verwertenden Denitrifikanten war bereits an dem Gasverbrauch erkennbar. Aus solchen Anreicherungskulturen wurde in Erlenmeyerkolben und Reagensgläser überimpft, die unter derselben Atmosphäre in Wittschen Töpfen geschüttelt wurden. Die letzten Spuren von Sauerstoff wurden durch alkalisches Pyrogallol beseitigt; die Entfärbung des Methylenblau-Indicators zeigte die Abwesenheit von Sauerstoff an. Nach mehrfachen Übertragungen in flüssige

Nährböden wurde das Wachstum immer schwächer. Erst nach Zusatz von Bodenextrakt und 0,05% Hefeextrakt wuchsen Suspensionen, die vorwiegend aus Diplokokken bestanden.

Ausstriche auf Glucose-Nitrat-Agar führten zwar zu Einzelkolonien, die auch isoliert werden konnten; nach Rückübertragung auf Mineralnährlösung und organische Nährlösungen traten aber immer wieder nebeneinander Kokken und Kurzstäbchen sowie abweichend geformte Zellen auf. Schließlich gelang es, aus den mit sumpfigem Ackerboden aus

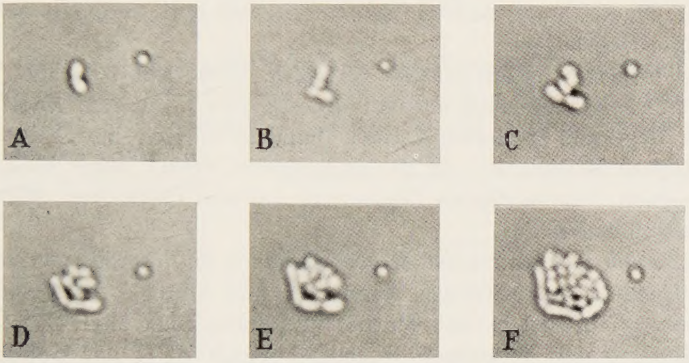

Abb. 1 A—F. Serienaufnahmen einer Einzell-Teilung bis zur Koloniebildung im Agarhängetropfen. A Zeitpunkt 0; B nach 4; C nach 6,5; D nach 9,25; E nach 11,25 und F nach 16 Std. Vergrößerung 1100fach

Förste beimpften Anreicherungskulturen mit Hilfe des Mikromanipulators[1] Einzelzellen zu isolieren und die Teilung und Koloniebildung im Agarhängetropfen zu beobachten und in Serienaufnahmen festzuhalten (Abb. 1).

Auch an dieser Reinkultur war festzustellen, daß die Gestalt der Zellen verhältnismäßig variabel ist. Dieser *Micrococcus* tritt nicht nur in Form von regelmäßigen Diplokokken auf, sondern auch in länglichen Formen als Kurzstäbchen. Manche Zellen haben Tropfen- oder sogar Hantelform. An diesen stäbchenförmigen Zellen werden auch zwei polständige stärker lichtbrechende Körperchen beobachtet.

Nachdem durch Rückübertragung auf Mineralmedium sichergestellt war, daß der isolierte Stamm wirklich rein war und sowohl chemoorganotroph als auch chemolithotroph zu wachsen vermochte, konnte der Stamm auf die verwertbaren Substrate geprüft werden. Auf folgenden Substraten erfolgte sehr gutes Wachstum (A), gutes (B), mäßiges (C) und geringes (D) Wachstum:

A: Glucose, Fructose, Glycerin, Äthanol, Isopropanol, Fumarsäure, Milchsäure, Essigsäure, Äpfelsäure, Glykolsäure, Asparaginsäure, Crotonsäure; B: Galaktose, Mannit, Bernsteinsäure; C: Ribose, Brenztraubensäure, Ameisensäure;

[1] Herrn Prof. Dr. R. Meyer danke ich für die Hilfe bei den Ein-Zell-Isolierungen.

D: Xylose. Folgende geprüfte Substrate ermöglichen kein Wachstum: Lactose, Sorbose, Arabinose, Sorbit, Methanol, Oxalsäure, Isovaleriansäure, Isobuttersäure, Buttersäure, Propionsäure, Glykokoll. Auf verschiedenen Substraten (Mannose, Ribose, Isopropanol, Ameisensäure) war erst nach 6 Tagen Wachstum festzustellen.

Mikroskopisch ließen sich zum Teil starke morphologische Veränderungen erkennen. Bei Wachstum auf Brenztraubensäure traten sehr große, gestaltvariable Zellen auf. Auf Äpfelsäure erreichten die Zellen den dreifachen Durchmesser normaler Zellen (Glucose). Auf Ameisensäure traten lange Doppelzellen auf, desgleichen auf Asparaginsäure.

Auf Glucose-Agar sind die Kolonien rund und weiß mit schwach gewölbter Oberfläche.

Der isolierte Stamm enthält Katalase, verflüssigt Gelatine, bildet weder Schwefelwasserstoff noch Indol, reduziert Nitrat und Nitrit.

Bei dem neu isolierten Stamm handelt es sich um *Micrococcus denitrificans* Beijerinck[1]. Er ist gramnegativ, bildet keine Sporen, ist unbeweglich, tritt häufig als *Diplococcus* auf und neigt dazu, Stäbchenform anzunehmen.

Er wächst auf zahlreichen Kohlenhydraten und organischen Säuren. Als N-Quelle kann er Nitrate, Ammoniak und Aminosäuren verwerten. Organotroph wächst er mit Glucose und Ammoniak ohne Zusatz von Wuchsstoffen und Vitaminen; chemolithotroph ist er auf Hefeextrakt angewiesen.

2. Wachstumsphysiologische Untersuchungen

Durch seine Fähigkeit, sowohl molekularen Wasserstoff als auch Glucose und eine große Anzahl anderer organischer Substrate als H-Donator verwerten und O_2, Nitrat, Nitrit und N_2O als H-Acceptor nutzen zu können, gehört *Micrococcus denitrificans* zu den vielseitigsten Organismen. Was ihn von vergleichbaren, mit den gleichen oder ähnlichen enzymatischen Eigenschaften ausgestatteten Bakterien unterscheidet, ist die Möglichkeit, alle durch Kombination dieser H-Donatoren und H-Acceptoren möglichen Elektronentransportvorgänge zur Energiegewinnung und zum Wachstum auszunützen.

Ruhende Zellen vermögen, wenn sie unter geeigneten Bedingungen der enzymatischen Induktion gewachsen sind, folgende Umsetzungen durchzuführen:

I. aerob mit Glucose als H-Donator

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O. \qquad (1)$$

II. aerob mit H_2 als H-Donator

$$2\ H_2 + O_2 \rightarrow 2\ H_2O. \qquad (2)$$

III. anaerob mit Glucose als H-Donator

a) mit Nitrat als H-Acceptor

$$5\ C_6H_{12}O_6 + 24\ NO_3' \rightarrow 30\ CO_2 + 12\ N_2 + 18\ H_2O + 24\ OH' \qquad (3)$$

[1] Für eine Nachprüfung und Bestätigung unserer Identifikation danke ich Herrn Dr. T. MARTINEC in Brünn.

b) mit Nitrit als H-Acceptor

$$C_6H_{12}O_6 + 8\ NO_2' \rightarrow 6\ CO_2 + 4\ N_2 + 2\ H_2O + 8\ OH', \quad (4)$$

c) mit Lachgas als H-Acceptor

$$C_6H_{12}O_6 + 12\ N_2O \rightarrow 6\ CO_2 + 12\ N_2 + 6\ H_2O. \quad (5)$$

IV. anaerob mit H_2 als H-Donator

a) mit Nitrat als H-Acceptor

$$2\ NO_3' + 5\ H_2 \rightarrow N_2 + 4\ H_2O + 2\ OH', \quad (6)$$

b) mit Nitrit als H-Acceptor

$$2\ NO_2' + 3\ H_2 \rightarrow N_2 + 2\ H_2O + 2\ OH', \quad (7)$$

c) mit Lachgas als H-Acceptor

$$N_2O + H_2 \rightarrow N_2 + H_2O. \quad (8)$$

Zunächst wurde das Wachstum an der Zunahme der Trübung unter den vier Bedingungen (Umsatzgleichungen 1, 2, 3 und 6) nebeneinander verfolgt. Alle Nährlösungen enthielten sowohl Ammon-Stickstoff (als N-Quelle) als auch Nitrat (als H-Acceptor). Da Vorversuche bereits ergeben hatten, daß *Micrococcus denitrificans* unter C-autotrophen Bedingungen viel langsamer wächst als mit Glucose, wurde vermutet, daß das selbst unter aeroben Verhältnissen intermediär auftretende Nitrit das Wachstum hemmt. Neben Extinktionsmessungen wurden daher auch Nitritbestimmungen durchgeführt.

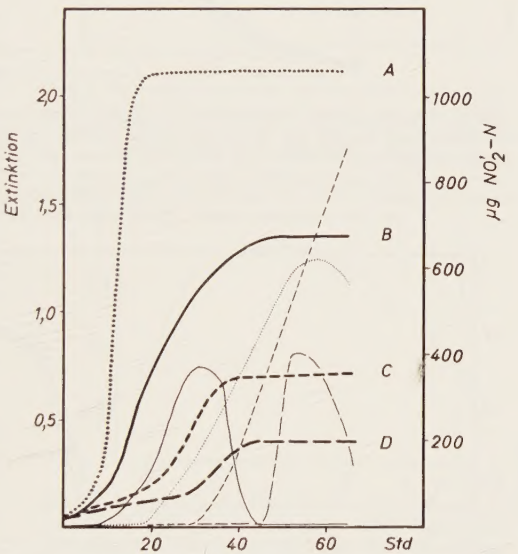

Abb. 2. Wachstum von *Micrococcus denitrificans* unter den vier Standardbedingungen. Je 3 l 0,5% Nitrat enthaltende Nährlösung wurden mit den entsprechenden Zusätzen versehen, mit 100 ml einer zwei Tage alten Vorkultur beimpft und in 6 l-Zweihalskolben unter den entsprechenden Gasgemischen gerührt. Nach verschiedener Zeitintervallen wurden die Extinktion und der Nitritgehalt bestimmt. *A* aerob mit Glucose und Nitrat (· · · · · ·), *B* anaerob mit Glucose und Nitrat (———), *C* aerob mit H_2, CO_2 und Nitrat (– – – –), *D* anaerob mit H_2, CO_2 und Nitrat (— — —). Die dünnen Linien geben den Nitritgehalt zu den entsprechenden Wachstumskurven an

Aus Abb. 2 ist ersichtlich, daß die oxydative Verwertung von Glucose unter aeroben Bedingungen das schnellste Wachstum ermöglicht. Zur Anhäufung von Nitrit kam es im allgemeinen erst nach Erreichen höherer Suspensionsdichten, also unter Bedingungen der Begrenzung des Wachstums durch mangelnde Nachdiffusion des Sauerstoffs aus der Atmosphäre. Unter anaeroben Bedingungen ist die Geschwindigkeit des Wachstums

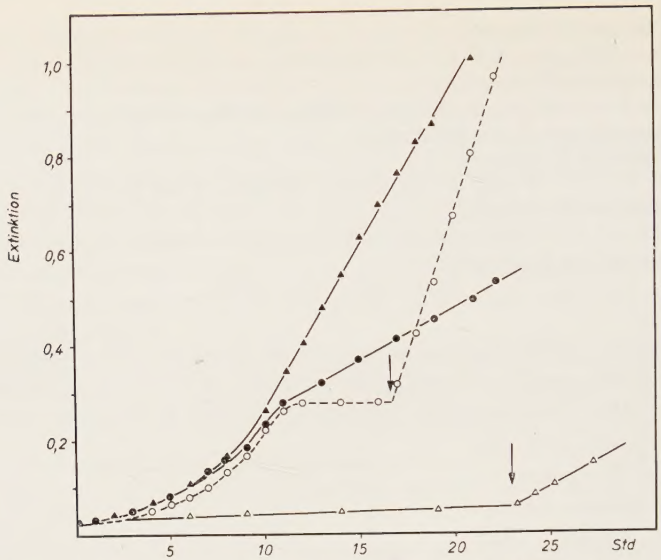

Abb. 3a. Wachstum unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat und Lachgas als H-Acceptoren. Drei 6 l-Rührkolben wurden mit je 3 l Nährlösung gefüllt, mit 120 ml einer 2 Tage alten Flüssigkeitskultur beimpft und bei 28° C und 600 U/min gerührt. Mit Nitrat und Lachgas (90% N_2O, 10% CO_2) (▲———▲), mit Lachgas (90% N_2O, 10% CO_2) (●———●), mit begrenzender Nitratmenge unter einem Gemisch von 90% N_2 und 10% CO_2, später (Pfeil) unter 90% N_2O und 10% CO_2 (○– – – –○), ohne H-Acceptoren, später (Pfeil) unter 90% N_2O und 10% CO_2 (△———△)

Abb. 3b. Wachstum unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat und Nitrit. Drei 6 l-Rührkolben wurden mit je 3 l Nährlösung gefüllt, mit 120 ml einer 2 Tage alten Flüssigkeitskultur beimpft und bei 28° C und 600 U/min gerührt. ●———● mit begrenzender Nitratmenge; ○———○ mit begrenzender Nitritmenge; △———△ ohne Nitrat- und Nitritzusatz. Gasatmosphäre: 90% N_2, 10% CO_2 (Pfeil: nochmalige begrenzende Nitrat- bzw. Nitritgabe)

geringer; Nitrit wird schon in einem frühen Stadium der Entwicklung der statischen Kultur angehäuft, dann aber weiterreduziert.

Das Wachstum unter chemolithotrophen Bedingungen (jedoch in Gegenwart von Hefe- und Bodenextrakt) ist erheblich geringer. Auch hier tritt Nitrit auf. Die angetroffenen Nitritkonzentrationen sind jedoch so gering, daß das langsame Wachstum oder der Wachstumsstillstand nicht auf eine Nitrithemmung zurückgeführt werden kann. Aus diesen Versuchen geht noch nicht hervor, ob das Wachstum nicht zum überwiegenden Teil auf Kosten des zugesetzten Hefeextraktes erfolgte und organisches Material unter Energiegewinnung durch H_2-Oxydation eingebaut worden ist (metatrophes Wachstum nach Lwoff 1943).

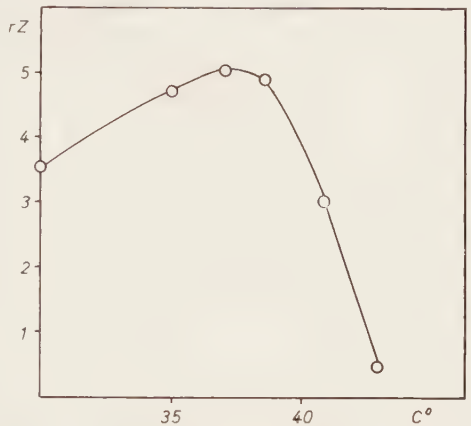

Abb. 4. Temperatur-Optimum des Wachstums. Die Kurve gibt die relative Zunahme der Gasaufnahme unter Wachstumsbedingungen zwischen der 200. und 400. min bei verschiedenen Temperaturen wieder

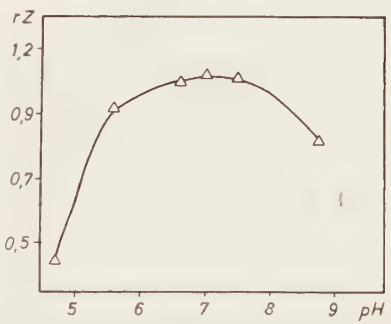

Abb. 5. pH-Optimum des Wachstums. Die Kurve gibt die relative Zunahme der Gasaufnahme unter Wachstumsbedingungen zwischen der 420. und 720. min bei verschiedenen pH-Werten wieder

Wie aus Abb. 3a und 3b hervorgeht, werden außer Nitrat auch Nitrit und Lachgas (N_2O, Stickoxydul oder Distickstoffoxyd) als H-Acceptoren verwertet.

Die optimale Wachstums-Temperatur (Abb. 4) wurde anhand der O_2-Aufnahme während des Wachstums mit Glucose als Substrat in Warburggefäßen bestimmt. Das Optimum liegt bei 36,5 C, bei 43 C beträgt die Wachstumsgeschwindigkeit weniger als 10%.

Das pH-Optimum (Abb. 5) liegt bei pH 7,5, jedoch ist die Gasaufnahme während des Wachstums zwischen pH 6.5 und 7.8 nahezu gleich hoch.

3. Die Synthese von Poly-β-hydroxybuttersäure

Nachdem Vorversuche ergeben hatten, daß aerob mit Glucose gewachsene Zellen Poly-β-hydroxybuttersäure anhäufen, wurde *Micro-*

coccus denitrificans mit Glucose als Substrat und begrenzender N-Quelle (160 mg NH_4Cl/l) herangezogen. Das Wachstum wurde an der Trübungszunahme und durch Proteinbestimmung verfolgt. Außerdem wurde die Abnahme der Glucose in der Nährlösung gemessen.

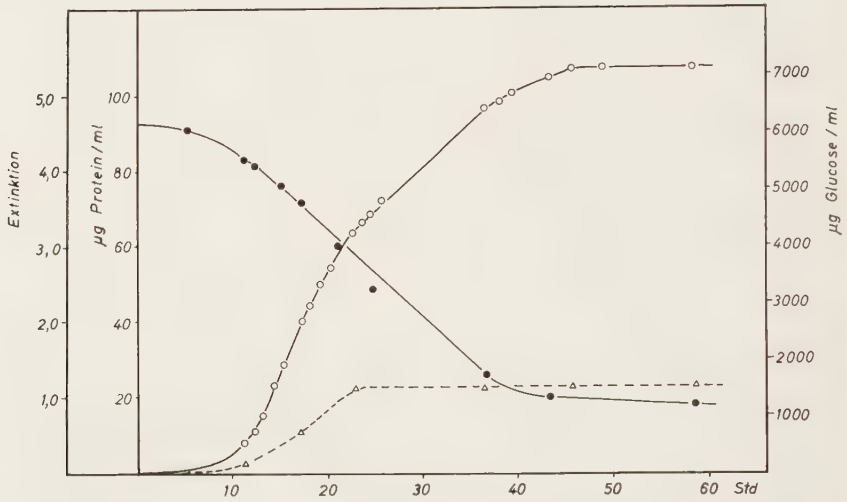

Abb. 6. Wachstum und Speicherung von Poly-β-hydroxybuttersäure bei Wachstumsbegrenzung durch N-Mangel. Die Nährlösung enthielt 7,0 g Glucose und 160 mg NH_4Cl/l und wurde in 6 l-Rührkolben bei 28° C und 600 U/min unter einem Luftstrom von 2,1 l/min gerührt. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden Proben entnommen und auf den Gehalt an Glucose und Protein sowie die Extinktion geprüft. Extinktion (○———○), Glucose (inμ g/ml) (●———●), Protein (in μg/ml) (△ · · △)

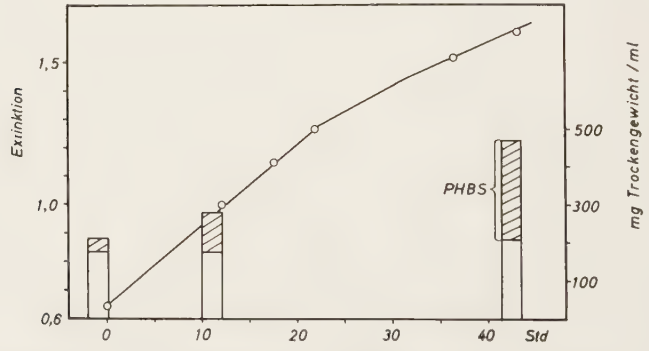

Abb. 7. Verhältnis von Extinktionsanstieg, Trockengewichts- und PHBS-Zunahme während des Glucoseumsatzes durch eine gewaschene Suspension in Abwesenheit einer N-Quelle. Die Zellen wurden in 6 l-Rührkolben bei 28° C und 600 U/min unter einem Luftstrom von 2,1 l/min gerührt. Die Nährlösung enthielt einen Überschuß von Glucose (2%). Die Höhe der Säulen entspricht dem Trockengewicht, der schraffierte Teil dem Gehalt an PHBS. Extinktionszunahme ○———○

In arithmetischer Auftragung (Abb. 6) nimmt die Trübung nach einer Anlaufphase zunächst nahezu geradlinig zu. Nach Verbrauch der zu-

gesetzten N-Quelle bleibt auch der Proteingehalt der Suspension konstant, und der Trübungsanstieg erfolgt weniger schnell. Die nach Verbrauch des Ammonstickstoffs zu beobachtende Zunahme der Extinktion rührt von der Synthese von PHBS, also einer Verfettung der Zellen, her, die unter Volumenzunahme der Zellen erfolgt. Obwohl noch Glucose im Medium vorhanden war, kam der Trübungsanstieg nach 45 Std zum Stillstand. Die Zellen enthielten 63% PHBS. Offenbar war mit diesem PHBS-Gehalt die maximale Speicherkapazität der Zellen erreicht.

Daß es sich bei der nach Somogy-Nelson bestimmten Restglucose auch wirklich um Glucose und nicht um andere reduzierende Substanzen handelte, wurde durch papierchromatographischen Nachweis der Glucose überprüft. Es waren keine Anzeichen von anderen Zuckern oder reduzierenden Verbindungen vorhanden.

Während des Wachstums unter chemolithotrophen Bedingungen und anaeroben Wachstums mit Glucose wurde in keinem Falle eine Anhäufung von PHBS festgestellt. Zu einer nennenswerten Akkumulation von PHBS kommt es also offenbar auch bei *Micrococcus denitrificans* nur in Abwesenheit einer N-Quelle oder, wenn andere Faktoren die Proteinsynthese und das Zellwachstum unterbinden. Da *Micrococcus denitrificans* KNO_3 nicht nur als H-Acceptor, sondern auch als N-Quelle verwerten kann, Nitrat also bis zur Stufe des Ammoniaks zu reduzieren vermag, ist in Gegenwart von Nitrat nicht mit PHBS-Anhäufung zu rechnen, wenn das Wachstum nicht durch den Mangel an einem anderen zum Wachstum notwendigen Faktor (P, S) begrenzt wird.

Inwieweit verschiedene Substrate unter aeroben Bedingungen in Abwesenheit einer N-Quelle zur PHBS-Synthese und Anhäufung verwertet werden können, wurde an gewaschenen Suspensionen von *Micrococcus denitrificans* untersucht. Als Maß der PHBS-Anhäufung benutzte ich bei diesen Versuchen die Zunahme der Trübung. Wird PHBS gespeichert, so nimmt die Trübung zu. Wie die Zunahme der Extinktion, des Zelltrockengewichtes und des PHBS-Gehaltes der Suspension miteinander in Beziehung stehen, wurde in einem Versuch an einer auf Glucose gezogenen Suspension überprüft (Abb. 7).

Die dreimal mit Phosphatpuffer (pH 7,0) gewaschenen Zellen wurden in Phosphatpuffer suspendiert und mit 2% Glucose versetzt und unter Luft gerührt. Nach 10,5 bzw. 43,5 Std wurden Trockengewicht, Trübung und PBHS-Gehalt bestimmt. Tab. 1 gibt die Meßwerte wieder.

Während das Trockengewicht der Zellen in 43,5 Std von 0,207 mg auf 0,470 mg/ml, also um das 2,27fache ansteigt, erhöht sich die Extinktion von 0,644 auf 1,6, also um den Faktor 2,49. Die Extinktion steigt bei der Speicherung von PHBS 2,49/2,27 = 1,1 mal rascher an als das Trockengewicht. Bei der Versuchswiederholung ergab sich ein Faktor von 1,22. Für *Hydrogenomonas* wurde für das gleiche Verhältnis

ein Faktor von 1,1 ermittelt (WILDE 1961). Dieser Faktor ergibt sich dadurch, daß PHBS eine fettartige Verbindung ist, die stärker lichtbrechend ist als andere Zellsubstanzen. Während der Speicherung

Tabelle 1. *Zunahme von Extinktion, Trockensubstanz und Poly-β-hydroxybuttersäure einer gewaschenen Suspension von Micrococcus denitrificans mit Glucose als C- und Energiequelle unter aeroben Bedingungen*

Entnahmen der Proben nach Stunden	Versuch I		Versuch II	
	0	10,5	0	43,5
Extinktion	1,03	1,92	0,644	1,6
Trockensubstanz in mg/ml	0,284	0,43	0,207	0,47
PHBS in mg/ml	0,043	0,176	0,032	0,263
PHBS in % der Trockensubstanz	15	41	15	55

Tabelle 2. *Rate der PHBS-Synthese und der Veratmung verschiedener Substrate durch gewaschene Suspensionen, die auf Glucose gewachsen waren*

Substrat	relative Extinktionszunahme		Substratatmung/Leeratmung	
	Vers. I	Vers. II	Vers. I	Vers. II
Glucose	1,4	1,2	7,5	6,5
Na-Lactat	1,3	1,2	5,3	6,2
Na-Succinat	1,2	1,1	4,2	3,9
Glycerin	1,0	1,1	2,5	2,3
Acetat	—	1,1	1,9	1,6
Fructose	—	1,1	3,1	3,5

nimmt das Trockengewicht um 263 mg/1000 ml zu, und diese Menge entspricht genau der gebildeten PHBS. Es entsteht keine andere Speichersubstanz. Die Speicherung verläuft zum Schluß nicht mehr linear. Das liegt daran, daß sich die Zellen dem maximalen Einbau an PHBS nähern.

Nach der geschilderten Überprüfung ist es zulässig, in Routineversuchen von der Extinktionszunahme auf die Speicherung von PHBS zu schließen. Zunächst wurde die PHBS-Anhäufung mit verschiedenen Substraten durch Zellen verfolgt, die auf Glucose gewachsen waren. Es stellte sich heraus, daß auf Glucose gewachsene Zellen nur mit Glucose als Substrat PHBS von Anfang an mit maximaler Rate anhäufen. Andere Substrate (Lactat, Succinat, Glycerin) werden erst nach einer Anlaufphase verwertet, während der die Extinktion sogar zurückgeht. Zusammenfassend ist festzustellen, daß diejenigen Substrate, die das Wachstum ermöglichen, auch zur Synthese von PHBS verwertet werden. In Tab. 2

ist die Einbaurate der Oxydationsrate mit verschiedenen Substraten gegenübergestellt.

Zur Erleichterung des Vergleiches wurde die relative Zunahme berechnet, also der Quotient aus Extinktionszunahme zwischen der 3. und 6. Std und der Extinktion nach der 3. Std. Auf Glucose gewachsene Zellen verwerten die folgenden Substrate in der Reihenfolge abnehmender Rate: Glucose, Lactat, Succinat, Glycerin und Acetat (Abb. 8).

Die Substratoxydation, gemessen an der O_2-Aufnahme im manometrischen Verfahren, durch Zellen, die mit Glucose gewachsen waren,

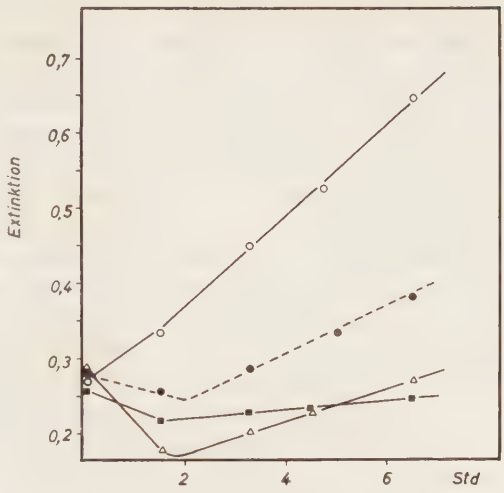

Abb. 8

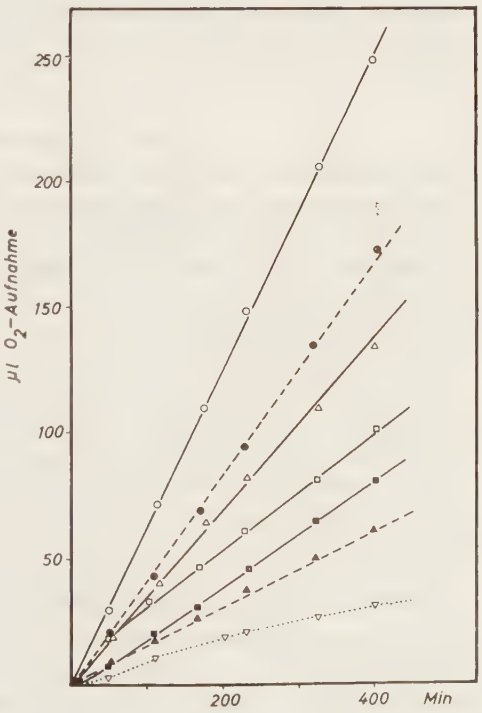

Abb. 9

Abb. 8. Einbau von Glucose, Glycerin, Lactat und Succinat in Zellen, die auf Glucose (aerob) gewachsen waren. Den zweimal in Phosphat-Puffer gewaschenen und in demselben Puffer suspendierten Zellen wurden 2% des zu testenden Substrates zugefügt. Glycerin (■———■), Succinat (△———△), Lactat (●- - -●), Glucose (○———○)

Abb. 9. Veratmung von Glucose, Fructose, Glycerin, Lactat, Succinat, Pyruvat und Acetat durch Zellen, die auf Glucose (aerob) herangezogen worden waren. Manometrische Messungen in zweiarmigen Warburggefäßen bei einer Substratkonzentration von 2% und 0,2 ml 20% KOH im Zentralgefäß. Glycerin (■———■), Succinat (△———△), Lactat (●- - -●), Glucose (○———○), Fructose (□———□), Acetat (▲- - -▲), endogene Atmung (▽·····▽)

erfolgt in allen Fällen nahezu ohne Anlaufphase (Abb. 9). Die zur Einschleusung der verabreichten Substrate in den Intermediärstoffwechsel notwendigen Enzyme scheinen also von Anfang an in ausreichender Konzentration für eine für dieses Substrat typische maximale Atmungsrate vorzuliegen; zur gleichzeitigen Speicherung, den erhöhten Substratdurchsatz vorausgesetzt, bedarf es jedoch einer zusätzlichen Enzymbildung, was in der Anlaufphase der Trübungszunahme zum Ausdruck kommt.

Zellen, die nicht auf Glucose, sondern auf Brenztraubensäure, Glycerin, Essigsäure gewachsen waren, speicherten PHBS ohne Anlaufphase, wenn die Wachstumssubstrate gereicht wurden. Auf Brenztraubensäure gewachsene Zellen erwiesen sich für Brenztraubensäure adaptiert; auf Acetat gezogene Zellen waren an Acetat, Brenztraubensäure und Milchsäure adaptiert, und auf Glycerin gezogene Zellen speicherten mit Glycerin, Brenztraubensäure und Milchsäure ohne Anlaufphase. Die Geschwindigkeit der Trübungszunahme war in allen Fällen mit Acetat am geringsten.

Eine Steigerung der Syntheserate durch simultane Oxydation von H_2 wurde nicht beobachtet. Wurden Zellen zunächst auf Glucose, dann einen Tag lang ohne Glucose unter Knallgas herangezogen, so war zwar Hydrogenase vorhanden, die Trübungszunahme mit Glucose als Substrat erfolgte jedoch unter Luft und Knallgas mit nahezu gleicher Geschwindigkeit.

4. Gaswechselmessungen

Durch Vergleich des Gaswechsels unter verschiedenen Bedingungen sollte ein Einblick in das Verhältnis der Aktivität der am H-Donator und am H-Acceptor angreifenden Terminalenzyme gewonnen werden. Die Fähigkeit, als H-Donator sowohl Glucose als auch molekularen Wasserstoff verwerten zu können, legt die Frage nahe, ob durch beide Reaktionen gleich viel Wasserstoff für den Wasserstofftransport über die Atmungskette zur Verfügung gestellt wird und ob die Nitratreduktion bei beiden H-Donatoren mit der gleichen Geschwindigkeit erfolgt. Andererseits vermögen die Zellen nach geeigneter Vorbehandlung sowohl O_2 als auch Nitrat, Nitrit und Lachgas als H-Acceptoren zu verwerten. Auch hier bestand die Frage, ob alle H-Acceptoren mit der gleichen Geschwindigkeit reduziert werden.

a) Molekularer Wasserstoff als H-Donator

Zur Messung der Geschwindigkeit der H_2-Aufnahme mit Sauerstoff, Nitrat und Methylenblau als H-Acceptoren wurden die Zellen ohne organisches Substrat mit Nitrat unter einer sauerstofffreien Atmosphäre von $H_2 + CO_2$ herangezogen. In Parallelansätzen wurde die Geschwindigkeit der Gasaufnahme an gewaschenen Suspensionen bestimmt (Abb. 10).

Unter einer CO_2-freien Atmosphäre von H_2 und O_2 wird molekularer Wasserstoff durch Sauerstoff oxydiert; nur $^2/_3$ des aufgenommenen Gases entsprechen der H_2-Aufnahme; es werden 138,5 μl Gas, also 93,0 μl H_2 in 1 Std aufgenommen.

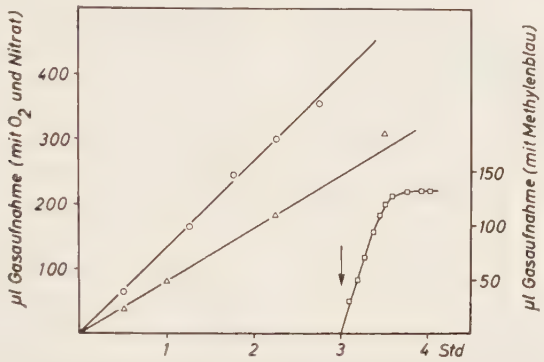

Abb. 10. Raten der H_2-Aufnahme mit Sauerstoff, Nitrat, Nitrit und Methylenblau als H-Acceptoren durch gewaschene Suspensionen von Zellen, die ohne organisches Substrat mit Nitrat unter einer H_2-CO_2-Atmosphäre gewachsen waren. Die Zellen wurden dreimal in 0,066 m Phosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen und in demselben Puffer suspendiert. An Nitrat wurden 200 μMol, an Methylenblau 5 μMol zugesetzt, 0,2 ml 20% KOH im Zentralzylinder. Die Suspension enthielt 1,2 mg Protein pro Warburggefäß. Gasaufnahme (in μl/Warburggefäß) mit O_2 als H-Acceptor unter 80% H_2 + 20% O_2 (○———○), mit Nitrat als H-Acceptor unter H_2 (△———△), mit Methylenblau als H-Acceptor unter H_2 (□———□)

In Gegenwart von Kohlendioxyd (Tab. 3) war eine erhöhte Gasaufnahme zu beobachten (188 μl Gasgemisch/Std). Ob diese gesteigerte Gasaufnahme eine CO_2-Fixierung als direkte Ursache hat oder ob CO_2 den Elektronentransport durch Ermöglichung endogener Syntheseprozesse steigert, wie es bei *Hydrogenomonas* der Fall ist (Schlegel u. Bartha 1961), ließ sich nicht entscheiden.

Unter einer CO_2-freien H_2-Atmosphäre wird zugesetztes Nitrat zu N_2 reduziert. Dabei werden nach (6)

$$2\,NO_3' + 5\,H_2 \rightarrow N_2 + 4\,H_2O + 2\,OH'$$

Wasserstoff aufgenommen und Stickstoff freigesetzt. Für 4 manometrisch gemessene Mole Gas sind 5 Mole H_2 verbraucht worden. Aus der in Abb. 10 wiedergegebenen Gasaufnahme errechnet sich eine H_2-Aufnahme von 110 μl H_2/Std. Die in Gegenwart von CO_2 gemessene höhere Gasaufnahme-Rate dürfte zum größten Teil auf die Alkalisierung des Mediums und Überführung des der Atmosphäre beigemischten Kohlendioxyds in Bicarbonat zurückzuführen sein, ist also kein echter biologischer Effekt (Tab. 3).

Unter einer H_2-Atmosphäre wird zugesetztes Methylenblau zu Leucomethylenblau reduziert. Während dieses Reduktionsvorganges

wird H_2 mit einer Rate von 294 μl H_2/Std aufgenommen. Die Gegenwart von CO_2 bewirkt eine Steigerung auf 375 μl H_2/Std.

Aus den geschilderten Versuchen, deren Ergebnisse in Tab. 3 zusammengestellt sind, geht bereits hervor, daß die Hydrogenaseaktivität während der Knallgasreaktion nicht voll ausgelastet wird. Mit molekularem Wasserstoff als H-Donator wird der Wasserstofftransport über die Atmungskette demnach durch die sauerstoffseitigen Terminalenzyme begrenzt. Hydrogenase liegt im Überschuß vor.

Tabelle 3. *Die Geschwindigkeit der H_2-Aufnahme durch gewaschene Suspensionen mit Sauerstoff, Nitrat und Methylenblau als H-Acceptor*

H-Acceptor	H_2-Aufnahme in μl H_2/Std	
	ohne CO_2	mit CO_2
Sauerstoff	93,0	125,4
Nitrat	110,0	179
Methylenblau	294,0	375

Diese Aussage, daß mit H_2 als H-Donator die Reaktionsgeschwindigkeit durch die Reduktionsrate des H-Acceptors bestimmt wird, findet ihre Bestätigung in Versuchen, bei denen Nitrat bzw. Nitrit als H-Acceptoren verabreicht wurden und aus deren Gaswechsel auf Grund der theoretischen Umsatzgleichungen (6 und 7) die H_2-Aufnahme-Rate der Nitrat- bzw. Nitritreduktion berechnet wurde.

In Abb. 11 geben die Geraden *a* und *b* die gemessenen Gasaufnahmen wieder. Nach

$$2\,NO_3' + 5\,H_2 \rightarrow N_2 + 4\,H_2O + 2\,OH' \qquad (6)$$

und

$$2\,NO_2' + 3\,H_2 \rightarrow N_2 + 2\,H_2O + 2\,OH' \qquad (7)$$

werden im Zuge der Nitratreduktion für 4 Mole Gasverbrauch 5 Mole H_2 aufgenommen und 2 Mole Nitrat reduziert. Im Zuge der Nitritreduktion werden für 2 Mole Gasverbrauch 3 Mole H_2 aufgenommen und 2 Mole Nitrit reduziert. *c* und *d* sind die für die H_2-Aufnahme, *e* und *f* die für den Nitrat-, bzw. Nitritumsatz errechneten Kurven.

Aus Abb. 11 ist ersichtlich, daß Nitrat und Nitrit mit nahezu derselben Rate umgesetzt werden, während sich die Raten der H_2-Aufnahme beträchtlich voneinander unterscheiden. Unter den gegebenen Bedingungen wird also der Elektronentransport durch irgendeinen Schritt auf dem Weg der Reduktion von Nitrit zu N_2 begrenzt und die volle Kapazität der Hydrogenase wird nicht ausgelastet.

Wird während der Nitratreduktion Nitrit zugefügt, so sinkt die Gasaufnahme sofort ab; die Rate der Gasaufnahme nimmt einen mittleren Wert an. Dies deutet darauf hin, daß Nitrat und Nitrit gleichzeitig nebeneinander reduziert werden (Abb. 12).

Daß die Nitritreduktion bei *Micrococcus denitrificans* durch die Gegenwart von Kohlendioxyd nicht beeinflußt wird, geht aus dem in

Abb. 13 wiedergegebenen Versuch hervor. Die Raten der Nitritabnahme sind in beiden Fällen ($- CO_2$) im Bereich der Fehlergrenzen gleich, während die Gasaufnahme-Raten recht verschieden sind. Dieser Versuch beweist auch, daß es sich bei der Erhöhung der H_2-Aufnahme durch

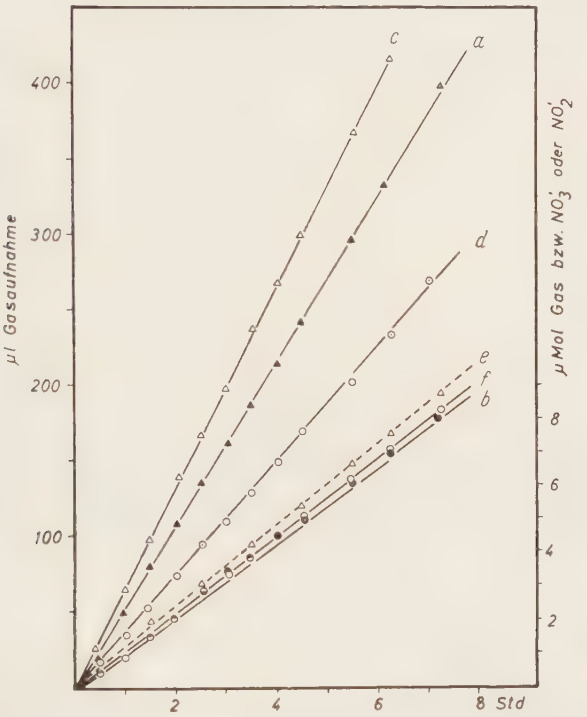

Abb. 11. Die Gasaufnahme, H_2-Aufnahme und der Nitrat- bzw. Nitritumsatz durch *Micrococcus denitrificans*. (Gewachsen unter H_2-Atmosphäre mit Nitrat bzw. Nitrit als H-Acceptor). Warburggefäße mit 2,8 ml Suspension; 0,2 mMol Nitrat bzw. Nitrit; H_2-Atmosphäre; 0,2 ml 20% KOH im Zentralzylinder. *a* Gasaufnahme mit Nitrat als H-Acceptor (in µl) (▲———▲), *b* Gasaufnahme mit Nitrit als H-Acceptor (in µl) (●———●), *c* H_2-Aufnahme mit Nitrat, nach (6) aus *a* berechnet (△———△), *d* H_2-Aufnahme mit Nitrit nach (7) aus *b* berechnet (⊙———⊙), *e* umgesetztes Nitrat, nach (6) aus *a* berechnet (△- - - -△), *f* umgesetztes Nitrit, nach (7) aus *b* berechnet (○———○)

CO_2 bei der Nitratreduktion (Tab. 3) um einen Artefakt handelt, der durch CO_2-Absorption in dem durch Denitrifikation alkalisch werdenden Medium zustande kommt.

b) Glucose als H-Donator

An gewaschenen, anaerob mit Glucose und Nitrat gewachsenen Suspensionen wurde die O_2-Aufnahme unter aeroben Bedingungen und die N_2-Entwicklung aus Nitrat unter anaeroben Bedingungen mit Glucose als H-Donator gemessen.

Unter aeroben Bedingungen wird Glucose nach

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \rightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O \qquad (1)$$

oxydiert. In dem in Abb. 14 dargestellten Versuch wurden 75,3 μl O_2/Std aufgenommen, folglich 0,558 μMol Glucose/Std oxydiert.

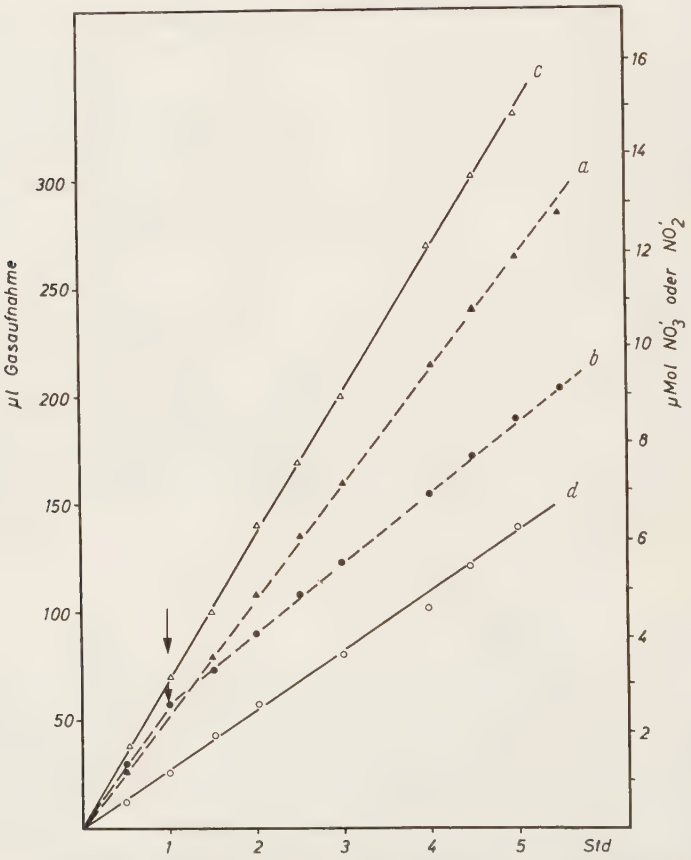

Abb. 12. Die Gasaufnahme und H_2-Aufnahme mit Nitrat und Nitrit als H-Acceptoren durch gewaschene Suspensionen, die anaerob mit H_2, CO_2 und Nitrat gezogen waren. Warburggefäße mit 2,8 ml Suspension; 0,2 mMol Nitrat bzw. 0,28 mMol Nitrit; H_2-Atmosphäre; 0,2 ml 20% KOH im Zentralzylinder. *a* Gasaufnahme mit Nitrat als H-Acceptor (in μl) (▲----▲), *b* Gasaufnahme mit Nitrat als H-Acceptor (●----●), nach 1 Std wurden 0,28 mMol Nitrit aus dem Seitenarm herübergeholt. *c* H_2-Aufnahme mit Nitrat, nach (6) aus *a* berechnet (△———△), *d* umgesetztes Nitrat, nach (6) aus *a* berechnet (○———○)

Unter anaeroben Bedingungen wird Glucose in Gegenwart von Nitrat nach

$$5\,C_6H_{12}O_6 + 24\,NO_3' \rightarrow 30\,CO_2 + 12\,N_2 + 18\,H_2O + 24\,OH' \qquad (3)$$

oxydiert. Einer Freisetzung von 12 Molen N_2 entspricht also die Oxydation von 5 Molen Glucose. Wenn in dem in Abb. 14 wiedergegebenen

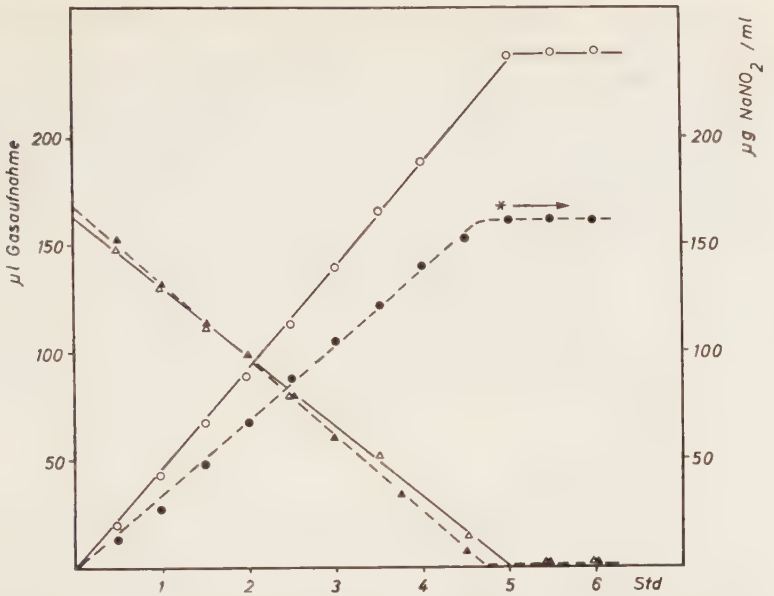

Abb. 13. Nitritreduktion durch H_2 in Gegenwart und Abwesenheit von Kohlendioxyd. Autotroph gezogene Zellen wurden in 0,066 m Phosphat-Puffer (pH 7,0) gewaschen und in demselben Puffer suspendiert. An Nitrit wurden 7,5 µMol gegeben. Die Gasatmosphäre bestand aus 100% H_2 (●----●) bzw. aus 85% H_2 und 15% CO_2 (○——○), Nitritabnahme ohne CO_2-Zusatz (▲----▲), Nitritabnahme mit CO_2-Zusatz (△——△); * → die zur Reduktion des zugesetzten Nitrits theoretisch notwendige Menge H_2

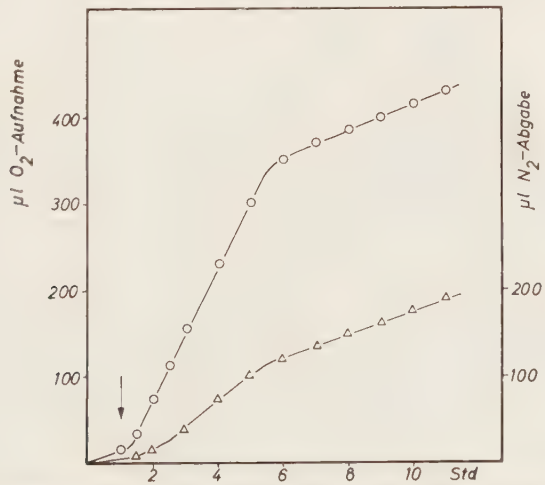

Abb. 14. O_2-Aufnahme unter aeroben und N_2-Entwicklung aus Nitrat unter anaeroben Bedingungen mit Glucose als H-Donator. Anaerob mit Glucose und Nitrat unter N_2-Atmosphäre gezogene Zellen wurden dreimal in Phosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen und in demselben Puffer suspendiert. 2,8 ml Suspension im Warburggefäß; 0,05 mMol Nitrat und 7,5 µMol Glucose; 0,2 ml 20% KOH im Zentralzylinder; Luft bzw. O_2-freier Stickstoff im Gasraum. Gasaufnahme (in µl/Warburggefäß) mit O_2 als H-Acceptor (○——○), N_2-Entwicklung (in µl/Warburggefäß) mit KNO_3 als H-Acceptor (△——△)

Versuch 30,8 μl N_2/Std entwickelt wurden, so wurden demnach 0,573 μMole Glucose/Std oxydiert.

Die Geschwindigkeit der Glucoseoxydation ist folglich unter aeroben und anaeroben Bedingungen nahezu gleich, und es liegt die Annahme nahe, daß der Elektronentransport mit Glucose als Substrat durch den Glucoseabbau begrenzt wird und die Terminalenzyme des H-Acceptors im relativen Überschuß vorliegen. Weitere Experimente haben diese Schlußfolgerung bestätigt.

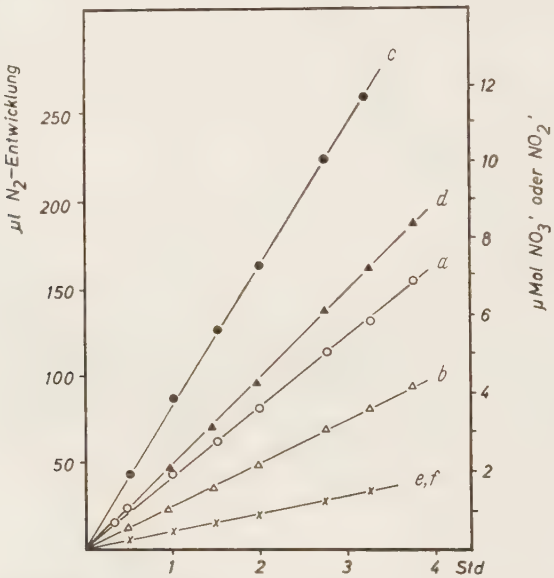

Abb. 15. Die N_2-Entbindung durch *Micrococcus denitrificans* (gewachsen auf Glucose-Nitrat-Nährlösung) mit Nitrit und Nitrat als H-Acceptor. Warburggefäße mit 2,8 ml Suspension; 0,2 mMol Nitrat bzw. Nitrit und 15 μMol Glucose; im Zentralgefäß 0,2 ml 20% KOH; O_2-freier Stickstoff im Gasraum. *a* N_2-Entwicklung mit Nitrit als H-Acceptor (in μl) (○———○), *b* N_2-Entwicklung mit Nitrat als H-Acceptor (△———△), *c* umgesetztes Nitrit, nach (4) aus *a* berechnet (●———●), *d* umgesetztes Nitrat, nach (3) aus *b* berechnet (▲———▲), *e* umgesetzte Glucose, nach (4) aus *a* berechnet und *f* umgesetzte Glucose, nach (3) aus *b* berechnet (×—×)

Der Versuch läßt weiterhin erkennen, daß die Glucose nicht vollständig oxydiert wird. Bereits nach Aufnahme eines Drittels des theoretisch zur vollständigen Oxydation der Glucose (7,5 μMol) benötigten Sauerstoffs knickt die Kurve ab und nimmt die Rate der endogenen Atmung an. Der überwiegende Teil der Glucose wird also in die Zellen eingebaut; unter aeroben Bedingungen wird PHBS angehäuft, unter anaeroben Bedingungen erfolgt, da Nitrat als N-Quelle genutzt wird, echtes Wachstum. Unter beiden Bedingungen nahm die Trübung merklich zu. Aus der Tatsache, daß die Rate der Glucoseoxydation in beiden Fällen gleich hoch ist und die Kurven in Abb. 14 etwa gleichzeitig ab-

knicken, folgt auch, daß der Betrag an freier Energie bzw. an durch oxydative Phosphorylierung erzeugter ATP in beiden Fällen nahezu gleich ist.

Die Schlußfolgerung, daß während der Verwertung von Glucose als H-Donator der Glucoseabbau und die Produktion an Reduktionsäquivalenten den Wasserstofftransport begrenzen, findet ihre Bestätigung in Versuchen, bei denen die Raten der N_2-Entwicklung mit Nitrat und Nitrit nebeneinander verfolgt worden sind. Die Suspensionen waren ebenfalls anaerob mit Glucose und Nitrat herangezogen worden.

Wie aus Abb. 15 ersichtlich ist, erfolgt die N_2-Entwicklung durch gewaschene Suspensionen mit Nitrit (Kurve *a*) rascher als mit Nitrat (*b*). Es liegt die Folgerung nahe, daß die maximal mögliche Geschwindigkeit der Nitritreduktion größer ist als die der Nitratreduktion. Berechnet man aber nach den Umsatzgleichungen

$$5\,C_6H_{12}O_6 + 24\,NO_3' \rightarrow 30\,CO_2 + 12\,N_2 + 18\,H_2O + 24\,OH' \qquad (3)$$

und

$$C_6H_{12}O_6 + 8\,NO_2' \rightarrow 6\,CO_2 + 4\,N_2 + 2\,H_2O + 8\,OH' \qquad (4)$$

die Raten des Glucoseabbaus und des Nitrat- bzw. Nitritverbrauchs, so resultiert ein anderes Bild. Der Nitritverbrauch (*c*) ist zwar höher als der Nitratverbrauch (*d*), die Raten des Glucoseabbaues sind jedoch nahezu gleich (*e*) und (*f*). Da in den vorangehenden Versuchen festgestellt worden war, daß die Raten der Nitrat- und der Nitritreduktion identisch sein können, wenn nur die Nachlieferung des Wasserstoffs (der Elektronen) mit ausreichender Geschwindigkeit erfolgt, deutet die Kongruenz der Kurven *e* und *f* darauf hin, daß der Glucoseabbau die Reaktion begrenzt. Bei der Nitratatmung mit Glucose sind also die Enzyme der Nitrat- und Nitritreduktion nicht völlig ausgelastet.

Die Vorversuche über die Hemmung der H_2-Oxydation und Glucoseoxydation durch Nitrit hatten ergeben, daß ein Nitritzusatz zu dem System Glucose-Nitrat (anaerob) die Rate der N_2-Produktion erhöht, ein Nitritzusatz zu dem System H_2-Nitrat aber die Gasaufnahme erniedrigt. Zunächst war man geneigt, darin einen verschiedenen Effekt zu sehen. In beiden Fällen wird jedoch Nitrit neben Nitrat angegriffen. Bei gleicher Geschwindigkeit des Elektronentransportes erfolgt die N_2-Entwicklung bei Nitritverwertung 1,66fach rascher als bei Nitratverwertung. Die raschere Gasentwicklung drückt sich in Gegenwart von Glucose in einer Erhöhung der Rate der N_2-Produktion, in Gegenwart von H_2 jedoch in einer Verminderung der Rate der Gasaufnahme aus.

Diskussion

Micrococcus denitrificans wurde erstmals aus denitrifizierenden Rohkulturen isoliert, die Seignettesalz (K-Na-Tartrat) als Kohlenstoff- und Energiequelle enthielten (Beijerinck u. Minkman 1910). Beijerinck stellte fest, daß *Micrococcus denitrificans* ebenso wie *Pseudomonas*

aeruginosa und *Pseudomonas stutzeri* Distickstoffoxyd bilden und daß dieses nach Aufbrauch des Nitrats ebenfalls zu Stickstoff reduziert wird. An einer Rohkultur stellte BEIJERINCK nach der Söhngenschen Doppelflaschenmethode auch schon das Wachstum von Mikroorganismen in einer einfachen mineralischen Nährlösung unter einem Gemisch von Wasserstoff und Distickstoffoxyd fest und schloß daraus bereits auf eine neue Art von Chemosynthese, bei der Wasserstoff oxydiert wird und Distickstoffoxyd als H-Acceptor wirkt. 1940 arbeitete VAN OLDEN über die Wirkung spezifischer Hemmstoffe auf den Denitrifikationsprozeß mit *Micrococcus denitrificans* und erkannte bereits den adaptiven Charakter des Nitratase-Enzymsystems; Nitratase war nur in den Zellen vorhanden, die mit Nitrat als einzigem H-Acceptor, also anaerob, gewachsen waren.

Die terminalen Oxydasen wurden dann zunächst von VERNON u. WHITE (1957) untersucht. Cytochrom-Oxydase aus *Micrococcus denitrificans* oxydierte auch reduziertes tierisches Cytochrom *c*; es besteht keine Spezifität der Oxydase für das eigene Cytochrom. An zellfreien Extrakten von Zellen von *Micrococcus denitrificans*, die aerob und anaerob mit und ohne Glucose bzw. Nitrat gewachsen waren, wurde die Aktivität der Hydrogenase, der NADH-Nitrat-Reduktase und der Wasserstoff-Nitrat-Reduktase bestimmt. Die Versuche bestätigten die bereits von VAN OLDEN sowie KLUYVER u. Mitarb. an intakten Zellen erhobenen Befunde. Auch die Hydrogenase war am aktivsten, wenn die Funktion anderer Dehydrogenasen (Glucose-Abbau) während des Wachstums ausgeschaltet waren. Die zellfreien Extrakte katalysieren auch die Reduktion von Cytochrom *c* durch NADH oder Wasserstoff; in letzterem Falle wirkt NAD katalytisch. Reduziertes Cytochrom *c* wurde durch Zusatz von Nitrat schnell oxydiert. Für die Beteiligung von Flavin an der Atmungskette spricht die Hemmung der Knallgasreaktion durch Mepacrin; die Hemmung ließ sich durch FMN aufheben.

Untersuchungen zum Stoffwechsel und zur Frage der CO_2-Fixierung unter C-autotrophen Bedingungen wurden erstmals von KORNBERG, COLLINS u. BIGLEY (1960) angestellt. Sie zogen *Micrococcus denitrificans* wie ein Knallgasbakterium in Mineralsalz-Nährlösung unter CO_2-haltiger Knallgas-Atmosphäre. $^{14}CO_2$ wurde zunächst in phosphorylierte Verbindungen eingebaut. Als frühzeitig markierte Verbindung trat 3-Phospho-Glycerinsäure auf. Zellfreie Extrakte dieser Zellen katalysierten den Einbau von $^{14}CO_2$ in 3-Phospho-Glycerinsäure, sofern Ribulose-1,5-diphosphat oder Ribose-5-phosphat und ATP vorhanden waren. Diese Ergebnisse können als hinreichender Beweis angesehen werden, daß CO_2 nach dem Calvin-Cyclus assimiliert wird. C-heterotroph gewachsene Zellen enthielten die Enzyme des Calvin-Cyclus nicht. Auf Acetat gezogene Zellen enthielten die für den Glyoxylsäure-Clyclus charakteristischen Enzyme Iso-Citratase und Malat-Synthetase.

Im Zuge der Untersuchung der Nitrat-Reduktion bei mehreren Mikroorganismen erfaßten Pichinoty u. D'Ornano (1961a) auch die Sauerstoffempfindlichkeit der Ausbildung der Nitrat-Reduktase bei *Micrococcus denitrificans*. Danach enthalten aerob kultivierte Zellen keine Nitrat-Reduktase; anaerob kultivierte verfügen über die maximale Aktivität sowohl der Nitrat-Reduktase als auch der Cytochrom-Oxydase. Die Enzyme der aeroben Atmung sind folglich als konstitutiv anzusehen. In einer zweiten Arbeit weisen die Autoren nach, daß *Micrococcus denitrificans* mit Distickstoffoxyd als einzigem H-Acceptor zu wachsen vermag (Pichnoty u. D'Ornano 1961b). Aus der Beobachtung, daß die Distickstoffoxyd-Reduktion zu Stickstoff durch Cyanid in Konzentrationen gehemmt wird, die keinen Einfluß auf die Reduktion von Nitrit zu Stickstoff haben, ist zu schließen, daß Distickstoffoxyd kein Zwischenprodukt der Denitrifikation ist, sondern auf einem Seitenweg liegt.

Unlängst haben Kornberg u. Morris (1963) an *Micrococcus denitrificans* einen neuen Weg der Verwertung und Einschleusung von Glyoxylsäure in den Stoffwechsel aufgefunden. Danach wird Glyoxylsäure zu Glykokoll reduktiv aminiert; dieses Glykokoll bildet mit überschüssiger Glyoxylsäure Hydroxy-Asparaginsäure, welche desaminiert und als Oxalessigsäure in den Tricarbonsäure-Cyclus eingeführt wird.

Obwohl sich *Micrococcus denitrificans* nach dem angegebenen Verfahren unschwer anreichern und isolieren läßt, fiel es schwer zu der Überzeugung zu gelangen, daß es sich um eine Reinkultur handelt. Selbst der schließlich als Ein-Zell-Kultur isolierte Stamm variierte morphologisch und trat in Form von Kokken, Diplokokken und von Kurzstäbchen auf. Diese gestaltliche Variabilität scheint bei Mikrokokken verbreitet zu sein. Nach Bergey sowie Verhoeven, Koster u. van Nievelt (1954) ist auch der Beijerincksche Stamm morphologisch sehr variabel. Gestaltliche Veränderungen treten unter dem Einfluß verschiedener Substrate und Salzkonzentrationen (Voss 1951) und auch bei Vitaminmangel auf; *Micrococcus glutamicus* wächst in einer Glucose-Bouillon-Nährlösung in Form von Kokken oder Kurzstäbchen, auf einem Biotin-Mangel-Medium in Form septierter Kurzstäbchen (Kinoshita 1962). Möglicherweise handelt es sich bei *Micrococcus glutamicus* um einen Stamm von *Arthrobacter* (Veldkamp, Berg u. Zevenhuizen 1963).

PHBS scheint das als Speicherstoff bei Bakterien am weitesten verbreitete Lipid zu sein. Es wurde bereits bei *Micrococcus halodenitrificans* beschrieben, wo es bis zu 40—60% des Trockengewichtes angereichert wird (Sierra u. Gibbons 1962, 1963). In *Micrococcus denitrificans* wird es nur mit organischen Substraten und unter Bedingungen gebildet, die die Proteinsynthese nicht zulassen. Es wurde bis zu 63% des Trockengewichtes angehäuft. Die Tatsache, daß es unter C-autotrophen Bedin-

gungen niemals gespeichert wurde, deutet bereits auf die begrenzte Leistungsfähigkeit des CO_2-fixierenden Systems hin.

Die vorgelegten Versuche haben die Frage, warum die Wachstumsgeschwindigkeit unter autotrophen Bedingungen, insbesondere anaerob mit Nitrat, so gering ist, noch nicht klären können. Eine anfangs vermutete besondere Nitrit-Empfindlichkeit der CO_2-Fixierung liegt nicht vor. In Abwesenheit von Hefeextrakt erfolgt kein Wachstum, aber auch in dessen Gegenwart ist sowohl die Wachstumsgeschwindigkeit als auch das Gesamtwachstum erheblich geringer als mit Glucose als Substrat. Es ist wahrscheinlich, daß wie bei *Desulfovibrio desulfuricans* (MECHALAS u. RITTENBERG 1960) die organischen Komponenten des Hefeextraktes unter Verwertung derjenigen Energie eingebaut werden, die bei der H_2-Oxydation mit Nitrat als H-Acceptor frei wird. Die Verhältnisse bei *Micrococcus denitrificans* unterscheiden sich jedoch von denen bei *Desulfovibrio desulfuricans* insofern, als bei letzterem eine signifikante autotrophe CO_2-Fixierung weder qualitativ noch quantitativ nachgewiesen werden konnte (STÜVEN 1960).

Micrococcus denitrificans fixiert dagegen nennenswerte Mengen Kohlendioxyd und verfügt über die Enzyme des reduktiven Pentosephosphat-Cyclus (KORNBERG, COLLINS u. BIGLEY 1960). Es sei darauf hingewiesen, daß dieser Nachweis des Calvin-Cyclus lediglich an Zellen erfolgte, die aerob mit Wasserstoff und Sauerstoff, also als Knallgasbakterien, gewachsen waren. *Micrococcus denitrificans* ist bisher das einzige Bakterium, das über die Enzyme des Calvin-Cyclus verfügt und im Zuge einer anorganischen Oxydation Energie gewinnen kann, aber trotzdem auf ein organisches Substrat angewiesen ist. Im Gange befindliche Untersuchungen (BANERJEE unveröffentlicht) zielen auf die quantitative Erfassung dieser Reaktionen ab.

KLUYVER u. Mitarb. hatten bereits festgestellt, daß die Enzyme der Nitrat-Reduktion lediglich unter anaeroben Bedingungen gebildet werden. Daß sie auch nur unter anaeroben Bedingungen funktionieren und daß unter aeroben Bedingungen keine nennenswerte N_2-Entwicklung erfolgt, haben PICHINOTY u. D'ORNANO (1961) gezeigt. Während die Zellen unter anaeroben Bedingungen unter Glucoseverbrauch mit Nitrat und Nitrit die bilanzmäßig zu erwartende Produktionsrate von Stickstoff aufweisen, nehmen dieselben Zellen unter Luft Sauerstoff auf; die Nitrit-Reduktion ist daher sehr gering.

Aerob gewachsene Zellen verwerten Glucose mit Nitrat und Nitrit unter N_2-Entwicklung, dabei ist die Rate der Gasentwicklung mit Nitrit größer als mit Nitrat. Bei allen Wiederholungen dieser Versuche wurde Glucose mit beiden H-Acceptoren mit der gleichen Geschwindigkeit oxydiert. Die anhand der Umsatzgleichungen aus den Gasumsätzen errechneten Umsätze der Glucose waren identisch. Daraus

war zu schließen, daß der Glucoseabbau die Reaktion begrenzt. Demgegenüber wird die Gasaufnahme mit Wasserstoff als H-Donator durch die H-acceptorseitigen-Terminalenzyme begrenzt. Die Hydrogenase adaptierter Zellen wird nicht voll ausgelastet.

Die Untersuchungen mit gewaschenen Suspensionen wurden ursprünglich mit dem Ziel angestellt, die das Wachstum unter chemolithotrophen Bedingungen begrenzende Reaktion zu erfassen. Dieser Versuch hat letztlich nicht zum Erfolg geführt, lediglich die relativen Aktivitäten der an der Aktivierung des Wasserstoffs und an der Reduktion von Nitrat und Sauerstoff beteiligten Enzyme können abgeschätzt werden.

Zusammenfassung

1. Aus Ackerboden wurde durch Anreicherung in dem System H_2-CO_2-Nitrat *Micrococcus denitrificans* isoliert. Der Stamm wächst in Form von Kokken, Diplokokken, Kurzstäbchen oder morphologisch aberranten Formen. Unter chemolithotrophen Bedingungen wird Hefeextrakt benötigt; Bodenextrakt beschleunigt das Wachstum.

Als H-Acceptoren werden Sauerstoff, Nitrat, Nitrit und Distickstoffoxyd, als H-Donatoren eine große Zahl organischer Säuren, Alkohole, Zucker und molekularer Wasserstoff verwertet.

2. Mit Glucose als Substrat wird sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen Poly-β-hydroxybuttersäure (PHBS) intracellulär angehäuft, sofern das Wachstum durch Mangel an Stickstoff oder Phosphat begrenzt wird. Mit etwa 63% PHBS wird die maximale Speicherkapazität der Zellen erreicht. Von den geprüften Substraten wurde auch mit Fructose, Glycerin, Lactat, Pyruvat, Succinat und Acetat PHBS angehäuft; unter chemolithotrophen Bedingungen erfolgte keine Speicherung.

3. An H_2 adaptierte Zellen aktivieren H_2 mit höherer Geschwindigkeit als durch das Nitratreduktase-System aufgenommen werden kann. Demgegenüber wird die N_2-Entbindung mit Glucose als H-Donator durch den Glucoseabbau begrenzt. Nitrat und Nitrit werden gleichzeitig verwertet.

Kohlendioxyd hat auf die Geschwindigkeit der Nitratreduktion keinen Einfluß.

Summary

1. *Micrococcus denitrificans* was isolated from arable soil using enrichment cultures with H_2-CO_2 and nitrate. The strain grows as cocci, diplococci, short rods or aberrant forms. Under chemolithotrophic conditions yeast extract is necessary for growth; soil extract accelerates growth. Oxygen, nitrate, nitrite, and nitrogen oxide (N_2O) serve as hydrogen acceptors; a large number of organic acids, alcohols, sugars and molecular hydrogen can be used as hydrogen donors.

2. Under both aerobic and anaerobic conditions with glucose as a substrate, poly-β-hydroxybutyric acid (PHBA) is found as an intra-

cellular storage product when either nitrogen or phosphorus is growth-limiting. The maximum observed storage capacity of the cells corresponded to 63% PHBA. A number of the substrates tested, namely: fructose, glycerin, lactate, pyruvate, succinate and acetate led to the accumulation of PHBA. No storage of reserve material took place under chemolithotrophic conditions.

3. Cells adapted to hydrogen, activated hydrogen at a rate higher than that with which the nitrate reductase system could consume it. Denitrification with glucose as hydrogen donator was limited by degredation of the glucose. Nitrate and nitrite are consumed simultaneously. Carbon dioxide has no effect on the rate of nitrate reduction.

Herrn Prof Dr. H. G. SCHLEGEL danke ich für die Themastellung und die stete Förderung der Arbeit. Die Untersuchung wurde durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft und mit Forschungsmitteln des Landes Niedersachsen unterstützt.

Literatur

BEIJERINCK, M., u. D. C. J. MINKMAN: Bildung und Verbrauch von Stickoxydul durch Bakterien. Zbl. Bakt., II. Abt. **25**, 30—63 (1910).

BERGEY, D. H.: BERGEY's manual of determinative bacteriology. Bailliere: Tindall & Cox 1939.

FEWSON, C. A., and D. J. D. NICHOLAS: Respiratory enzymes in *Micrococcus denitrificans*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **48**, 208—210 (1961).

FOSTER, J. W.: Autotrophic assimilation of carbon dioxyde. C. H. WERKMAN u. P. W. WILSON, Bacterial Physiology, p. 361—403. New York 1951.

KINOSHITA, SH.: Production of amino acids with special consideration of the function of biotin. Recent Progress in Microbiology. VIII. International Congress for Microbiology, Montreal 1962. University of Toronto Press 1962.

KLUYVER, A. J.: Some aspects of nitrate reduction. Symposium, microbial metabolism. VI. International Congress for Microbiology, Rom 1953.

—, and W. VERHOEVEN: Studies on true dissimilatory nitrate reduction. IV. On adaptation in *Micrococcus denitrificans*. Antonie v. Leeuwenhoek **20**, 337—358 (1954).

KOCUR, M., and T. MARTINEC: A taxonomic study of the genus *Micrococcus*. J. gen. Microbiol. **28**, 6 (1962).

KORNBERG, H. L., J. F. COLLINS, and D. BIGLEY: The influence of growth substrates on metabolic pathways in *Micrococcus denitrificans*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **39**, 9—24 (1960).

, and J. G. MORRIS: β-hydroxyaspartate pathway: A new rute for biosyntheses from glyoxylate. Nature (Lond.) **197**, 456—457 (1963).

LWOFF, A.: L'évolution physiologique. Etude des pertes de fonction chez les microorganismes. Paris: Herrmann 1943.

MECHALAS, B. J., and S. RITTENBERG: Energy coupling in *Desulfovibrio desulfuricans*. J. Bact. **80**, 501—507 (1960).

VAN OLDEN, E.: Manometric investigations on bacterial denitrification. Ned. Akad. Wetenschappen **43**, 635—644 (1940).

PICHINOTY, F., et L. D'ORNANO: Recherches sur la réduction du protoxyde d'azote par *Micrococcus denitrificans*. Ann. Inst. Pasteur **101**, 418—426 (1961a).

— — Sur le méchanisme de l'inhibition par l'oxygène de la dénitrification bactérienne. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **52**, 386—389 (1961b).

Schlegel, H. G.: Die Speicherstoffe von *Chromatium okenii*. Arch. Mikrobiol. **42**, 110—116 (1962).
— Bildung von Speicherstoffen durch Knallgas- und Purpurbakterien. Vortr. dtsch. bot. Ges., N. F. **1**, 167—172 (1962).
—, u. R. Bartha: „Leerlauf"-H_2-Oxydation und „Rückkopplung" bei Knallgasbakterien. Naturwissenschaften **48**, 414—415 (1961).
— G. Gottschalk, and R. Bartha: Formation and utilisation of poly-β-hydroxybutyric acid by Knallgas-Bacteria *(Hydrogenomonas)* Nature (Lond.) **191**, 463—465 (1961).
— H. Kaltwasser u. G. Gottschalk: Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. Arch. Mikrobiol. **38**, 209—222 (1961).
Schmidt, K., S. L. Jensen u. H. G. Schlegel: Die Carotinoide der *Thiorhodaceae*. Arch. Mikrobiol. **46**, 117—126 (1963).
Sierra, G., and N. E. Gibbons: Production of poly-β-hydroxybutyric acid granules in *Micrococcus halodenitrificans*. Canad. J. Microbiol. **8**, 249—253 (1962).
— — Role and oxydation pathway of poly-β-hydroxybutyric acid in *Micrococcus halodenitrificans*. Canad. J. Microbiol. **8**, 255—269 (1962).
— — Sodium requirement of poly-β-hydroxybutyric acid depolymerase of *Micrococcus halodenitrificans*. Canad. J. Microbiol. **9**, 491—497 (1963).
Somogy, M.: Reagent for the determination of sugars. J. biol. Chem. **160**, 69 (1945). Nach Sakami: Handbook of Isotope Tracer Methods, p. 31—32 (1955).
Stüven, K.: Beiträge zur Kenntnis der CO_2- und Lactatassimilation von *Desulfovibrio aestuarii* (van Delden) Kluyver und van Niel. Arch. Mikrobiol. **36**, 31—45 (1960).
Ulrich, J. A., and M. Larsen: A single solution indicator for anaerobiosis. J. Bact. **56**, 373—374 (1948).
Umbreit, W. W., R. H. Burris, and J. F. Stauffer: Manometric Techniques, p. 15. Minneapolis: Burgess Publishing Co. 1957.
Veldkamp, H., G. van den Berg, and L. P. J. M. Zevenhuizen: Glutamic acid production by *Arthrobacter globiformis*. Antonie v. Leeuwenhoek **21**, 35—51 (1963).
Verhoeven, W.: Some remarks on nitrate and nitrite metabolism in microorganisms. Inorganic Nitrogen Metabolism, p. 61—86, d. by D. McElroy and B. Glass. Baltimore: The Hopkins Press 1956.
— Studies on true dissimilatory nitrate reduction. V. Nitric oxide production and consumption by microorganisms. Antonie v. Leeuwenhoek **22**, 385—406 (1956).
—, and A. J. Kluyver: Studies on true dissimilatory nitrate reduction. II. The mechanism of denitrification. Antonie v. Leeuwenhoek **20**, 241—263 (1954).
— A. L. Koster, and M. G. A. van Nievelt: Studies on true dissimilatory nitrate reduction. III. *Micrococcus denitrificans* Beijerinck a bacterium capable of using molecular hydrogen in denitrification. Antonie v. Leeuwenhoek **20**, 273—284 (1954).
Vernon, L. P., and F. G. White: Terminal oxidases of *Micrococcus denitrificans*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **25**, 321—328 (1957).
Voss, E.: Die Wirkung überoptimaler Konzentrationen einiger Neutralsalze auf kokkoide Bakterien. Arch. Mikrobiol. **18**, 101—132 (1952).
Wilde, E.: Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von *Hydrogenomonas*. Arch. Mikrobiol. **43**, 109—137 (1962).
Wilson, P. W., and S. G. Knight: Experiments in Bacterial Physiology, Nitritbestimmung. Minneapolis: Burgess Publishing Co. 1952.

Dr. Margarete Vogt,
Institut für Mikrobiologie der Universität, 34 Göttingen, Gosslerstr. 16

Lebenslauf

Am 15. August 1933 wurde ich, Margarete Vogt, als Tochter des Berginspektors Karl Vogt und seiner Ehefrau Margarete, geb. Levin, in Recklinghausen/Westfalen geboren. Im Herbst 1940 wurde ich eingeschult, mußte aber bald wegen der Kriegsereignisse Recklinghausen verlassen. In Osterode/Harz wurde der Unterricht fortgesetzt. 1945 kehrte ich nach Recklinghausen zurück; aber inzwischen waren die Verhältnisse derart erschwert, daß weder an einen geregelten Schulunterricht zu denken war noch besaßen meine Eltern ein Heim. So übersiedelte ich eineinhalb Jahr später erneut nach Osterode, wo ich dann die Oberschule besuchte und 1956 meine Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1956 begann ich in Göttingen mit dem Studium der Mikrobiologie. Im Wintersemester 1957/58 immatrikulierte ich mich in Tübingen, wo ich ein Jahr studierte und dann nach Göttingen zurückkehrte. Seit dem Sommersemester 1960 arbeite ich im Institut für Mikrobiologie an der vorliegenden Dissertation.

Meinen akademischen Lehrern bin ich zu großem Dank verpflichtet. Es sind dies die Herren Professoren und Dozenten: Brockmann, Bünning, Deuticke, Flammersfeld, Firbas, Glemser, Graeser, Harbers, Harder, Hollmann, Jost, Kaudewitz, Koch, Meyer, Metzner, Möhres, Möllenstedt, Pfennig, Piepho, Pirson, Rippel, Schlegel, Schwartzkopf, Schwemmle, Trebst, Ulrich und Zimmermann.